

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75341 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53, 9/02, 15/82, 1/19, C12P 7/64, C12Q 1/68, C11C 1/00, A01H 5/00
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05274
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 25 718.3 7. Juni 1999 (07.06.1999) DE
199 62 409.7 22. Dezember 1999 (22.12.1999) DE
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HEINZ, Ernst [DE/DE]; Ohnhorststrasse 18, D-22609 Hamburg (DE). STYMNE, Sten [SE/SE]; Torrlösa 1380, S-269 90 Svalöev (SE). LEE, Michael [NZ/SE]; Herman Ehles Väg 2-4, S-268 31 Svalöev (SE). GIRKE, Thomas [DE/US]; 16945 Vinaruz Place, San Diego, CA 92128 (US). SPERLING, Petra [DE/DE]; Grindelallee 45, D-20146 Hamburg (DE). ZAEHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Parkallee 22, D-23845 Borstel (DE).
- Veröffentlicht:
- Mit internationalem Recherchenbericht.
 - Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: Δ 6-ACETYLENASE AND Δ 6-DESATURASE FROM CERATODON PURPUREUS(54) Bezeichnung: Δ 6-ACETYLENASE UND Δ 6-DESATURASE AUS CERATODON PURPUREUS

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing unsaturated fatty acids and to a method for preparing triglycerides with an increased unsaturated fatty acid content. The invention also relates to the utilization of DNA sequences coding for Δ 6-acetylenase/ Δ 6-desaturases or Δ 6-desaturases for producing a transgenic organism, preferably a transgenic plant or a transgenic microorganism with an increased fatty acid, oil or lipid or content with Δ 6-triple bonds and/or Δ 6-double bonds.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von DNA Sequenzen codierend für Δ 6-Acetylenase/ Δ 6-Desaturasen bzw. Δ 6-Desaturasen zur Herstellung eines transgenen Organismus, bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ 6-Dreifachbindungen und/oder Δ 6-Doppelbindungen.

WO 00/75341 A1

$\Delta 6$ -Acetylenase und $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von

- 10 DNA Sequenzen codierend für $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturasen bzw. $\Delta 6$ -Desaturasen zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen und/oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

15

Außerdem betrifft die Erfindung eine isolierte Nukleinsäuresequenz; eine Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem be-

20 trifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

- Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen
- 25 in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden
- 30 beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie *Mortierella* oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form
- 35 ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

- Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung
- 40 Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Sie finden in verschiedenen diätischen
- 45 Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

- Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem
- 5 Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und
- 10 WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In
- 15 WO 96/13591 wird eine Δ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant
- 20 Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792).

- In WO 97/37033 wird eine Δ -12-Acetylenase beschrieben. Durch dieses Enzym lassen sich ungesättigte C_{18} -Fettsäuren mit einer Dreifachbindung herstellen. Derartige Fettsäuren können neben der
- 25 Anwendung in Nahrungsmittel aufgrund ihrer Reaktivität auch zur Herstellung von Polymeren verwendet werden. Sperling et al. berichtete auf einer Tagung (South Lake Tahoe, Canada, June 9 - 13, 1999) über die Klonierung eines Enzyms, das ebenfalls Dreifachbindungen in Fettsäuren einführt. Wobei sich die Substrate dieses
- 30 Enzyms von denen der Δ -12-Acetylenase unterscheiden und die Dreifachbindung an anderer Position durch das Enzym in die Fettsäuren eingeführt wird.

- In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums
- 35 zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg.
- 40 Eine Verschiebung des Fettsäurespektrum zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, daß die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen.

5

Es bestand daher die Aufgabe weitere Enzyme für die Synthese ungesättigter konjugierter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch eine isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit Δ -6-Acetylenase- und/oder

10 Δ -6-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,

15 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,

20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

25

Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 kodierten Enzyme oder deren enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die 30 dieselben enzymatischen Reaktionen wie die von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 kodierten Enzyme katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen in Δ 6-Position. Unter ungesättigten 35 Fettsäuren sind im folgenden einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen aufweisen, zu verstehen. Die Dreifach- und/oder Doppelbindungen können konjugiert oder nicht konjugiert sein. Die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten 40 Sequenzen kodieren für ein neue Enzyme, die eine Acetylenase- und/oder Δ 6-Desaturase-Aktivität aufweisen.

Das erfindungsgemäße Enzym Δ ⁶-Acetylenase/ Δ ⁶-Desaturase führt vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden eine *cis*-Doppel- 45 bindung in Position C₆-C₇ ein und/oder konvertiert eine bereits vorhandene *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ in eine Dreifachbindung (siehe SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3). Das Enzym hat

außerdem eine $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität, die vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ einführt. Diese Aktivität hat auch das Enzym mit der in SEQ ID NO: 11 genannten Sequenz. Bei dem es
5 sich um eine monofunktionelle $\Delta 6$ -Desaturase handelt.

Die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäuresequenz(en) (für die Anmeldung soll der singular den plural umfassen und umgekehrt) oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer
10 genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie speziell Moosen, Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

15

Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 70 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vorteilhaft mindestens 75 % Homologie, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp, BESTFIT, GAP, TRANSLATE bzw. BACKTRANSLATE
20 (= Bestandteil des Programmpaketes UWGCG, Wisconsin Package, Version 10.0-UNIX, January 1999, Genetics Computer Group, Inc., Deverux et al., Nucleic. Acid Res., 12, 1984: 387-395) verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153). Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete Aminosäuresequenzen sind Sequenz SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 und
30 SEQ ID NO: 12 zu entnehmen. Unter Homologie ist Identität zu verstehen, das heißt die Aminosäuresequenzen sind zu mindestens 70 % identisch. Die erfindungsgemäßen Sequenzen sind auf Nukleinsäureebene mindestens 65 % Homolog, bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 %.
35

Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.
40

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise
45 mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standard-

- bedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybrisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Acetylenase- und/oder Desaturasegenen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Vorteilhaft werden die Histidin-Box-Sequenzen verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.
- 15 Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

- Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden

und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

- Außerdem sind unter Homologen der Sequenzen SEQ ID NO: 1,
5 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren
10 können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

- Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen,
15 deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

- 20 Unter Derivaten sind auch die Antisense-DNAs zu verstehen, die zur Hemmung der Proteinbiosynthese der erfindungsgemäßen Proteine verwendet werden können. Diese Antisense-DNAs gehören zu den erfindungsgemäßen nichtfunktionellen Derivaten, wie Derivate, die
25 keine enzymatische Aktivität aufweisen. Weitere dem Fachmann bekannte Methoden der Herstellung von nichtfunktionellen Derivaten sind die sogenannte Cosuppression, die Verwendung von Ribozymen und Introns. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die Einzelstrang Nukleinsäuren wie mRNA, zu
30 denen sie eine Komplementarität aufweisen, schneiden können. Dadurch können mit Hilfe dieser Ribozyme (Haselhoff and Gerlach, Nature, 334, 1988: 585-591) mRNA-Transkripte katalytisch gespalten werden und so die Translation dieser mRNA unterdrückt werden. Derartige Ribozyme können speziell auf ihre Aufgaben hin
35 zugeschnitten werden (US 4,987,071; US 5,116,742 und Bartel et al., Science 261, 1993: 1411-1418). Mit Hilfe der Antisense-DNA können dadurch Fettsäuren, Lipide oder Öle mit einem erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren hergestellt werden.

- 40 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase kodieren, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen $\Delta 6$ -Acetylenase/
45 $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden

Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium glutamicum* ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

10

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für das $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen kodieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, das heißt die enzymatische Aktivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Codon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

20

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Gehaltes von $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen in Fettsäuren, Ölen oder Lipiden in der Pflanze durch Überexpression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8, 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C. et al., *Journal of Molecular Biology* 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten werden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität

sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative

- 5 Proteinsequenz, wie z.B. ein Signalsequenz für das ER, das das $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Vorteilhaft können die $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- bzw.

- 10 $\Delta 6$ -Desaturase-Gene im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acetyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen. Für die in-vivo und speziell in-vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen
- 15 vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

Unter den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind Proteine zu verstehen, die eine in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4

- 20 oder SEQ ID NO: 12 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Proteins erhalten
- 25 bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physiko-
- 30 chemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge ver-
- 35 tauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.

Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer

- 40 ursprünglich isolierten für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte Funktion, das heißt deren enzymatische Aktivität nicht wesentlich reduziert ist, zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen
- 45 oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der

5 $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

10 Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist (= Enzymaktivität stärker als die Aktivität des Ausgangsenzym, das heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

15 Die Nukleinsäuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäßen Expressionskassette geeignete codierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase mit den oben beschriebenen Sequenzen kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Über-
20 produktion von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen in $\Delta 6$ -Position verleihen. Diese Sequenzen können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

25 Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Gen-
30 expression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion
35 exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulations-
40 sequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch
45 einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regu-

- lationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor
- 5 das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-
- 10 Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die $\Delta 6$ -Acetylenase-/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.
- 15 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der
- 20 Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 25 Als Promotoren in der Expressionskassette sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere ein pflanzliche Promotoren oder Promotoren, die aus einem Pflanzenvirus entstammen. Vor-
- 30 teilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -P_R- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den
- 35 gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren wie CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos (= Nopalinsynthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die
- 40 Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen $\Delta 6$ -ACETYLENASE/ $\Delta 6$ -DESATURASE- und/oder $\Delta 6$ -DESATURASE-Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige vorteilhafte Pflanzen-
- 45 promotoren sind beispielsweise deer PRP1-Promotor [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993), 361-366], ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer

(Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO93/21334) Promotor. Weitere Pflanzen-
5 promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-
10 spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm
15 oder im sich entwickelnden Embryo. Insbesondere zu nennen sind vorteilhafte Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen
20 Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Bäumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67). Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle geeignete Promotoren wie der Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus
25 Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO91/13980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Bäumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren des lpt2-
30 oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen Gliadin-Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-
35 Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen und
40 Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP=unbekanntes Samenprotein, Bäumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):
45 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Bäumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):

233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des lpt2 oder lpt1-Gens aus Gerste (W095/15389 und W095/23230), die in monokotylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

- 5 In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die Gene der $\Delta 6$ -ACETYLENASE/ $\Delta 6$ -DESATURASE- und/oder $\Delta 6$ -DESATURASE liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die $\Delta 12$ -Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen, β -Ketoacyl-ACP-Synthasen oder β -Ketoacyl-ACP-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.

- Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungsgemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie unten beschrieben, verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- 25 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren) miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region

für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primer-repair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Sequenz sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die

Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Die DNA Sequenz codierend für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fettsäure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokalisation wünschenswert

und vorteilhaft sein und daher künstlich verändert oder verstärkt werden, sodaß auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

- 5 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER),
- 10 Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein.

- Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-
- 15 sequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenz-
- 20 assay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielsweise seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen,
- 25 das β -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das β -Glucuronidase-Gen, β -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizier-
- 30 barkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressions-
- 35 kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für die $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase DNA se-
- 40 quenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen
- 45 kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewähr-

leistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (= ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-
5 Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor), das zu
10 exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Die Expressionskassette wird zur Expression in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem
15 Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind
20 beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M13mp-Serie, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium
25 pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi] sowie in More
30 Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefepromotoren sind beispielsweise 2 μ M, pAG-1, YEpl6, YEpl3 oder pEMBLYe23. Beispiele für Algen- oder Pflanzenpromotoren sind
35 pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine
40 Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods
45 in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog.

shuttle-Vektoren oder binäre Vektoren, die in E. coli und Agrobacterium replizieren.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassette.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden. Fig. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-mit 35S-Promotor (C) bzw. pBin-USP mit dem USP-Promotor (D). Die Ausgangsvektoren sind in Fig. 1 A) und B) dargestellt.

Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.

In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusions-oligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins erfolgen
5 können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Proteinsyntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitätschromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig
10 werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine eingeführt, was die Abspaltung eines Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

15 Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase
20 beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A.

Weitere Beispiele für *E. coli* Expressionsvektoren sind pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] und pET Vektoren [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185,
25 Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, Niederlande].

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa
30 (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development
35 for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressions-
40 vektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf 9 Zellen. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

45 Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992)

"New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

5

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:

- 10 187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cyto-megalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
15 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispielsweise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.
- 20

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.
- 25
30

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise
- 35
40
45

- wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien
- 5 können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von
- 10 Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und
- 15 R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

- Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder
- 20 Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kultur-
- 25 pflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- 30 Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

- 35 Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren
- 40 bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie *Arabidopsis*, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen
- 45 wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen oder

Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Crypthecodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.

10

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

15 Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen codierend für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Ziel der Verwendung ist die Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit erhöhtem Gehalt an Dreifachbindungen und Doppelbindung in $\Delta 6$ -Position.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Fettsäuren, Öle oder Lipide mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen überproduzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanze enthaltend eine erfindungsgemäße funktionelle oder nicht funktionelle (= Antisense-DNA oder enzymatische inaktives Enzym) Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle oder nicht funktionelle Expressionskassette.

Die Expressionskassette oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaltend eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturasegenesequenz kann darüber hinaus auch zur Transformation der oben beispielhaft genannten Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen, Ciliaten

und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen eingesetzt werden.

- 5 Erhöhung des Gehaltes von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder
- 10 $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in den erfindungsgemäßen Organismen vorteilhaft in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen gegenüber den nicht gentechnisch modifizierten Ausgangspflanzen zumindest für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
- 15 Der Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden beispielsweise ist im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so daß eine samenspezifische Expression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder
- 20 Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.
- 25 Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.
- 30 Die Wirksamkeit der Expression des Transgens $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens und deren Auswirkung
- 35 auf die Fettsäure-, Öl- oder Lipidbiosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend eine

- 40 $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baum-
- 45 wolle, Zuckerrübe, Raps und Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung sind wie oben
5 beschriebenen transgene Pflanzen, die eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten. Unter nicht funktionell ist
10 zu verstehen, daß kein enzymatisch aktives Protein mehr synthetisiert wird. Außerdem ist unter nicht funktionellen Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukten auch eine sogenannte Antisense-DNA zu verstehen, die zu transgenen Pflanzen führt, die eine Reduktion der enzymatischen Aktivität oder keine enzymatischen Aktivität aufweisen. Mit Hilfe der Antisense-Technik,
15 speziell wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz mit anderen Fettsäuresynthesegenen in der Antisense-DNA kombiniert wird, ist es möglich Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren bzw. gesättigte Fettsäuren zu synthetisieren. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren
20 Kulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 25 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA'-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder
30 Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem
35 Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Dreifachbindungen oder delta-6-Doppelbindungen durch Expression dieser $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz.
40
- Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 10 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 45 - Verwendung der Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 10 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.

- Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes
- 5 Nukleinsäurekonstrukt in einen bevorzugt Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt. Diese ungesättigten Fettsäuren enthalten vorteilhaft $\Delta 6$ -Dreifach- und/oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen. Die Fett-
- 10 säuren können aus den Ölen bzw. Lipiden beispielsweise über eine basische Hydrolyse z.B. mit NaOH oder KOH freigesetzt werden.

- Auch ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekenn-
- 15 zeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens eine erfindungsgemäße Expressionskassette in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert, gehört zu den Erfindungsgegenständen.

- 20 Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit
- 25 mindestens einem der Protein, das durch eine der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 oder SEQ ID NO: 11 kodiert wird, inkubiert. Vorteilhaft wird das Verfahren in Gegenwart von Verbindungen durchgeführt, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können. Anschließend
- 30 können die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

- 35 Die oben genannten Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit $\Delta 6$ -Dreifach- und/oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

- Mit Hilfe der sogenannten Antisense-Technologie können in einem
- 40 Verfahren auch Fettsäuren oder Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren hergestellt werden.

- Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais,
- 45 Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Raps und Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Erdnuß, Rizinus, Kokosnuß, Ölpalme,

- Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Cyanobakterien, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie
- 5 Dinoflagellaten wie *Cryptothecodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Mikroorganismen wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, *Calendula*, Erdnuß, Kakao-
- 10 bohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, *Carthamus* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

- Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirts-
- 15 organismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden
- 20 oder nicht. Die Anzucht kann batch wise, semi batch wise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.
- 30 Pflanzen werden nach Transformation zunächst wie oben beschrieben regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. angebaut.

- Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher-
- 35 weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei
- 40 Temperaturen zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 20°C bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt.
- 45 Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO₂ erfolgen. Nach

Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über Säulen ist möglich.

- 10 Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicherweise verseift.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu werden diese den Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

- 20 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

- 25 Beispiel 1:

Allgemeine Klonierungsverfahren:

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2:

- 40 Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 3:

Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

- 5 Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen wurden binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nor-
- 10 deutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter
- 15 steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Konkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weiter-
- 20 geführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikromol Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten
- 25 sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium gegeben.

Beispiel 4:

- 30 Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

- Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Var. Columbia Col 0 (Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA) erfolgte mittels Blüteninfiltrationsmethode wie beschrieben bei: Bechtold, N., Ellis, J.
- 35 and Pelletier, G. in Planta, *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316 (1993), 1194-119 oder mittels Wurzeltransformationsmethode.

40 Beispiel 5:

- Die Transformation von Maispflanzen erfolgte wie bei Paredy, D., Petolino, J., Skokut, T., Hopkins, N., Miller, M., Welter, M., Smith, K., Clayton, D., Pescitelli, S., Gould, A., Maize Trans-
- 45 formation via Helium Blasting. Maydica. 42(2): 143-154, 1997, beschrieben.

Beispiel 6:

Isolierung und Klonierung der $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

5

Um DNA-Sequenzen aus *Ceratodon purpureus* zu isolieren, die für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und eine $\Delta 6$ -Desaturase kodieren, wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von DNA-Sequenzen abgeleitet, die für $\Delta 5$ - (EMBL Accession-Nr. Z81122) und

10 $\Delta 6$ -Fettsäure-Desaturasen (U79010, AJ222980, AF031477 kodieren:

Primer A: 5'-TGG TGG AA(A/G) TGG A(A/C)I CA(C/T) AA-3'
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
WWKW(N/T/K)H(N/K)

15

Primer B: 5'-(T/G)GI TGG AA(A/G) (T/G)(G/A)I (A/C)AI CA(C/T)
AA-3'
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
(G/W)WK(E/D/W)(N/Q/K)H(N/K)

20

Primer C: 5'-AT (A/T/G/C)T(T/G) (A/T/G/C)GG (A/G)AA (A/T/
G/C)A(A/G) (A/G)TG (A/G)TG -3', reverse primer, abge-
leitet von der Aminosäuresequenz (I/M)(H/Q/N)PF(L/F)HH

25 Mittels Polymerasekettenreaction (PCR) mit Einzelstrang-cDNA aus *C. purpureus* wurden mit Primer A und Primer C zwei DNA-Fragmente von 557 bp (Cer3) und 575 bp (Cer16) Länge und mit Primer B und Primer C ein DNA-Fragment von 560 bp (Cer1) Länge amplifiziert. Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt:

30 10 min bei 94°C, Pause für 'hot start' bei 72°C, gefolgt von 32 Zyklen von 20 s bei 94°C, 1 min bei 45°C (Bindungstemperatur, T_m) und 1 min bei 72°C, 1 Zyklus von 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Für die Amplifikation wurde die Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

35

Die oben genannten doppelsträngigen DNA-Fragmente aus den zwei PCR-Amplifikationen wurden in den pGEM-T Vektor (Promega) legiert, in *E. coli* XL1blue MRF' Kan (Stratagene) transformiert und mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready

40 Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) sequenziert. Die DNA-Teilsequenzen von Cer1 und Cer3 zeigten 70 % Identität. Die oben genannten DNA-Teilsequenzen kodierten ohne Primer für offene Leserahmen bei Cer1 von 173 Aminosäuren (SEQ ID NO: 5 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer1 und SEQ ID NO: 6 =

45 Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer1), bei Cer 3 von 172 Aminosäuren (SEQ ID NO: 7 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer3 und SEQ ID NO: 8 = Partielle deduzierte Amino-

säuresequenz von Cer3) und bei Cer16 von 178 Aminosäuren (SEQ ID NO: 9 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer16 und SEQ ID NO: 10 = Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer16). Die abgeleitete Proteinsequenz von Cer1 wies 64 % zu Cer3 und 28 % identische Aminosäuren zu Cer16 auf; Cer 3 und Cer16 wiesen wiederum 27 % identische Aminosäuren auf.

Die höchste Ähnlichkeit der Cer1- und Cer3-Proteine besteht zu der $\Delta 6$ -Acyllipid-Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Girke et al., Plant J., 15, 1998: 39-48), während Cer16 die höchste Ähnlichkeit zu der $\Delta 6$ -Acyllipid-Desaturase und der $\Delta 8$ -Sphingolipid-Desaturase aus höheren Pflanzen aufweist.

Eine gerichtete λ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* wurde von Fritz Thummler, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt (Pasentsis et al., Plant J., 13, 1, 1998: 51-61). Es wurde ein PCR-Test dieser *Ceratodon*-Bank durchgeführt, bei dem spezifische Primer von den oben genannten DNA-Teilsequenzen Cer1, Cer3 und Cer16 abgeleitet wurden:

Spezifische forward und reverse Primer:

Cer1: 5'-CGAATGAGTGCGACGAAC -3' + 5'-AATAACCTGGGCTCTCAC-3'
 Cer3: 5'-ATGAGGATATTGATACTCTC-3' + 5'-GCAATCTGGGCATTCACG-3'
 Cer16: 5'-GACATCAAAGCTCTTCTC-3' + 5'-GGCGATGAGAAGTGGTTC-3'

Eine Restriktionsanalyse (Hind III bzw. EcoR V) der aus der cDNA-Bank mittels PCR amplifizierten Produkte zeigte in allen drei Fällen das gleiche Restriktionsmuster wie das der PCR-Amplifikate aus der ss-cDNA, d.h. die *Ceratodon*-cDNA-Bank enthält die drei Klone Cer1, Cer3 und Cer16.

Beispiel 7:

cDNA-Bank Screening und Sequenzierung der "full length" Klone

DNA-Minipräparationen, der drei aus ss-cDNA amplifizierten PCR-Fragmente Cer1, Cer3, Cer16 von ~570 bp Länge in pGEM-T (siehe Beispiel 6) wurden für das weitere Screening der vollständigen Klone aus einer λ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* an M. Lee und S. Stymne abgegeben. Dieses cDNA-Bank-Screening führte bisher zu zwei vollständigen Klonen von Cer1 und Cer3 mit Inserts von ca. 2,2 kb, die als EcoR I / Kpn I-Fragmente aus dem λ ZAP-Vektor in die EcoR I / Kpn I-Schnittstellen des puc19-Vektors (New England Biolabs) subkloniert und in *E. coli* JM105 transformiert wurden.

Ein weiteres Screening der cDNA-Bank mit Cer1 und Cer3 als Hybridisierungsproben unter niedriger Stringenz zeigte, daß mindestens ein weiterer Cer1-homologer Klon existiert, der evtl. für die $\Delta 5$ -Desaturase kodieren könnte.

- 5 Zwei *E. coli*-Klone, Cer1-50 und Cer3-50, wurden vollständig sequenziert. Cer1-50 hat eine Länge von 2003 bp (SEQ ID NO: 1 = Nukleotidsequenz der $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen und polyA)
- 10 und kodiert für ein offenes Leseraster von 483 Aminosäuren (SEQ ID NO: 2 = deduzierte Aminosäuresequenz der $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*). Cer3-50 besitzt eine Länge von 2142 bp (SEQ ID NO: 11 = Nukleotidsequenz [2142 bp] der $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* mit 5'- und 3'-untrans-
- 15 latierten Regionen) mit einem offenen Leseraster von 520 Aminosäuren (SEQ ID NO: 12 = deduzierte Aminosäuresequenz der $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*). Beide Proteinsequenzen weisen N-terminal das hochkonservierte HPGG-Motiv des Cytochrom b_5 auf (Lederer F., Biochimie 76, 1994: 674-692) und C-terminal
- 20 die für Desaturasen charakteristischen drei Histidin-Boxen auf (Shanklin et al., Biochemistry, 33, 1994: 12787-12794). Sie stellen somit weitere Mitglieder der wachsenden Familie der Cytochrom b_5 -Fusionsproteine dar (Napier et al., Trends in Plant Science, 4, 1, 1999: 2-4). Das erste Histidin der dritten Box
- 25 ist gegen Glutamin ausgetauscht, einem weiteren Charakteristikum von $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Acylipid-Desaturasen sowie $\Delta 8$ -Sphingolipid-Desaturasen.

Beispiel 8:

- 30 Klonierung der gesamten funktionellen aktiven $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und $\Delta 6$ -Desaturase-Sequenz mittels PCR und die Bereitstellung dieser Sequenz für die Klonierung in Vektoren sowie funktionelle Expression in Hefe
- 35 Es wurde eine cDNA hergestellt, die für Enzyme mit $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aus *Ceratodon purpureus* codiert. Analog zu dem hier beschriebenen Beispiel wurde die $\Delta 6$ -Desaturase kloniert (siehe SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 12).
- 40 Hierzu wird zunächst anhand der Cer1-cDNA für die $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase aus *Ceratodon purpureus* die Oligonukleotide für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) abgeleitet.

Cer1: 5'- CC GGTACC **ATG** GCC CTC GTT ACC GAC-3' +
 5'- CC GAATTC **TTA** GTG AGC GTG AAG CCG-3'

Cer3: 5'- CC GGTACC **ATG** GTG TCC CAG GGC GGC-3' +
 5'- CC GAATTC **TCA** ACT CGC AGC AAG CTG-3'

Die folgenden Primer wurden abgeleitet von Cer1 für die Expression in Hefe angepaßt:

10 5'-Primer: 5'-AAAAGGATCCAAAATGGCCCTCGTTACCGAC-3'
 3'-Primer: 5'-AAAAGTCGACTTAGTGAGCGTGAAGCC-3'

In einer PCR Reaktion wird eine D6-Acetylenase/Desaturase cDNA aus *Ceratodon purpureus* als Matrize verwendet. Mithilfe der
 15 Primer wird eine BamHI-Restriktionsschnittstelle vor dem Startcodon der D6-Acetylenase/Desaturase cDNA eingeführt. Für eine gerichtete Klonierung wird hinter das Stopcodon eine SalI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/micro l Matrizen DNA, 0,5 micro M der Oligo-
 20 nukleotide und, 200 microm Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5 mM MgCl₂) und 0,02 U/micro l Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) und werden in einer PCR-Maschine der Firma Perkin Elmer mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

25
 Anlagerungstemperatur: 50°C, 52 sec
 Denaturierungstemperatur: 95°C, 52 sec
 Elongationstemperatur: 72°C, 90 sec
 Anzahl der Zyklen: 30

30 Das erhaltene Fragment von 1467 Basenpaaren wird in den mit EcoRV gespaltenen Vektor pBluescript SK- (Stratagene) ligiert. Durch Kontrollspaltung wird ein Klon identifiziert pBS-Cer1, dessen Insert durch BamHI/SalI in voller Länge exzisierbar ist (1452
 35 Basenpaare plus 15 Nukleotide Restriktionsschnittstellen) und folgende Sequenz aufweist (das Start- und Stopcodon ist unterstrichen, die Schnittstellen sind kursiv dargestellt). Analog kann auch eine cDNA Sequenz des Klones Cer50 genutzt werden. Dabei handelt es sich um eine monofunktionelle delta-6-Desaturase
 40 (siehe SEQ ID NO: 3). Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 4 zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Funktionalität des codierten Enzyms in einem Mikroorganismus, wird das 1467 bp BamHI/SalI-Fragment aus pBS-
 45 Cer1 in den BamHI/XhoI geschnittenen Expressionsvector pYES2 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und Hefe nach Standardprotokollen mit dem neu entstandenen Plasmid pYES2-Cer1

transformiert (siehe Transformationsprotokoll Invitrogen, Groningen, Niederlande). Erhaltene Kolonien werden auf Raffinosehaltigen Medium angezogen und mittels Galaktose die Genexpression der D6-Acetylenase/Desaturase induziert (siehe unten).

5

Beispiel 9:

Lipidanalyse von transformierten Hefen

- 10 Hefen können neben den eigenen Fettsäuren (16:0, 16:1, 18:0 und 18:1) auch exogene Fettsäuren in ihre Membranlipide inkorporieren. Um die Substratspezifität der jeweils exprimierten Desaturase zu testen, wird dem CM - 2 % Raffinose-Medium zur Solubilisierung exogener Fettsäuren 1 % Tergitol NP-40 (w/v,
- 15 Sigma) und 0,003 % der entsprechenden Fettsäure (Stammlösung: 0,3 % bzw. 3 % Fettsäure in 5 % Tergitol NP-40, w/v) vor der Inokulation zugegeben. Die Vorkultur erfolgte durch Inokulation von 3 ml CM- 2 % Raffinose-Medium / 1 % Tergitol NP-40 mit einer transgenen Hefekolonie und anschließender Inkubation für 2 d bei
- 20 30°C im Roller bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 4,0 bis 4,3. Für die Hauptkultur werden 10 ml CM- 2 % Raffinose/1 % Tergitol NP-40-Medium \pm 0,003 % Fettsäure mit einem Aliquot der Vorkultur (200 fache Verdünnung) ad OD_{600} 0,02 angeimpft und 24 h bei 30°C, 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die
- 25 Induktion der Testkulturen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} 0,5 bis 0,6) durch Zugabe von Galaktose ad 1,8 %. Die Ernte der induzierten Zellen erfolgte nach weiteren 24 h aeroben Wachstums bei 30°C bei einer OD_{600} von 4,0 bis 4,3.

- 30 Die induzierten Hefezellen werden durch 10 min Zentrifugation bei 2000 g geerntet, in 3 ml Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C abgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 N methanolischer Schwefelsäure und
- 35 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrom-
- 40 pack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Mono-, Di-, Tri- und Tetraensäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-
- Standards (Sigma) bestätigt. Für die Tri- und Tetraensäuren sind keine Referenzsubstanzen erhältlich. Ihre Identität und die Position der Dreifachbindung wird durch geeignete chemische
- 45 Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS von analysiert. Die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus den transgenen Hefen, die

mit dem Leervektor pYES2, mit pYES2-Cer1 ($\Delta 6$ -Acetylenase) transformiert werden, ist in Tab. 1 dargestellt. Die transgenen Hefezellen werden ohne exogenen Fettsäuren oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2), γ -Linolensäure (γ -18:3), α -Linolensäure (α -18:3) oder $\omega 3$ -Octadecatetraensäure (18:4) analysiert.

Tabelle 1 gibt die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2, der $\Delta 6$ -Acetylenase (Cer1/pYES2) und der $\Delta 6$ -Desaturase (Cer3/pYES2) transformiert wurden, wieder. Die transgenen Hefezellen wurden ohne exogenen Fettsäuren (-) oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2), γ -Linolensäure (γ -18:3), α -Linolensäure (α -18:3) oder $\omega 3$ -Octadecatetraensäure (18:4) analysiert. Fettsäurezusammensetzung in [mol %] der Gesamtfettsäuren, wobei die Inkorporation der gefütterten Fettsäuren (schwarzer Fettdruck), die Desaturierungsprodukte (in roter Farbe) und die Summe der Desaturierungsprodukte (letzte Zeile) bei den einzelnen Fütterungsversuchen angegeben sind.

20 Beispiel 10:

Erzeugung transgener Pflanzen, welche ein Enzym mit $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase-Aktivität überexprimieren.

Für die Transformation von Pflanzen wird ein Transformationsvektor erzeugt, der das BamHI/SalI-Fragment aus pBS-Cer1 in den mit BamHI/SalI gespaltenen Vektor pBin-USP oder in pBinAR ligiert wird. pBin-USP und pBinAR sind Derivate des Plasmides pBin19. pBinAR entstand aus pBin19, indem in pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711) ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. (1980) Cell 21, 285) inseriert wird. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., (1984) EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939 wird als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66, 221-230), wobei durch Umklonierung aus pBluescript mehrere Restriktionschnittstellen zwischen Promotor und Terminator zur Verfügung stehen. Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nicht-codierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz:

5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCCGGATCTGCTGGCTATGAA-3') . Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den Vektor pBinAR eingesetzt. Es entsteht das Plasmid mit der Bezeichnung pBinUSP.

5

Das Konstrukt wird zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* und Rapspflanzen eingesetzt.

- Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf D6-Acetylenase/Desaturase -Expression mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an Acetylenfettsäuren oder Doppelbindungen an der delta-6-position werden identifiziert. Es läßt sich in den stabil transformierten transgenen Linien, die das Transgen funktionell exprimieren, ein erhöhter Gehalt von Acetylenfettsäuren und Doppelbindungen an der delta-6-position im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen feststellen.

Beispiel 11:

Lipidextraktion aus Samen

25

Die Analyse von Lipiden aus Pflanzensamen verläuft analog der Analyse von Hefelipiden. Jedoch wird Pflanzenmaterial zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglich zu machen.

30

35

40

45

Tab. 1

| Fatty acids | pYES2 | | | | | Cer1/pYES2 | | | | | Cer3/pYES2 | | | | |
|-----------------------------|-------|------|----------------|----------------|------|------------|------|----------------|----------------|------|------------|------|----------------|----------------|------|
| [mol %] | - | 18:2 | γ -18:3 | α -18:3 | 18:4 | - | 18:2 | γ -18:3 | α -18:3 | 18:4 | - | 18:2 | γ -18:3 | α -18:3 | 18:4 |
| 16:0 | 26.2 | 24.1 | 27.8 | 27.4 | 32.7 | 24.2 | 23.1 | 26.2 | 25.7 | 26.5 | 26.5 | 23.3 | 28.1 | 29.2 | 29.6 |
| 16:1 ⁹ | 41.8 | 9.6 | 27.4 | 27.3 | 16.1 | 36.5 | 13.3 | 24.7 | 28.8 | 21.9 | 43.8 | 9.9 | 25.2 | 34.0 | 20.9 |
| 16:2 ^{6,9} | | | | | | 6.9 | 1.8 | 3.3 | 5.3 | 3.0 | 1.1 | | 0.1 | 0.8 | 0.1 |
| 18:0 | 6.5 | 5.3 | 6.1 | 6.1 | 7.9 | 6.4 | 6.1 | 6.6 | 6.5 | 7.1 | 5.5 | 5.3 | 6.3 | 5.8 | 5.9 |
| 18:1 ⁹ | 23.6 | 4.9 | 15.1 | 14.8 | 11.3 | 24.9 | 8.8 | 15.6 | 20.0 | 16.8 | 21.4 | 5.3 | 15.7 | 14.3 | 11.5 |
| 18:2 ^{6,9} | | | | | | 0.3 | | 0.2 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | | | 0.1 | |
| 18:2 ^{9,12} | 53.9 | | | | | 41.9 | | | | | | 42.3 | | | |
| 18:3 ^{6,9,12} | | | 19.5 | | | 0.8 | | 16.1 | | | | 8.1 | 21.2 | | |
| 18:3 ^{9,12,15} | | | 22.8 | | | | | | 10.0 | | | | | 11.9 | |
| 18:4 ^{6,9,12,15} | | | | | 28.8 | | | | 1.7 | 21.3 | | | | 1.9 | 30.1 |
| 18:3 ^{6yn,9,12} | | | | | | 1.3 | | 4.6 | | | | | | | |
| 18:4 ^{6yn,9,12,15} | | | | | | | | | 2.3 | | | | | | |
| Σ Des. [mol %] | - | - | - | - | - | 7.2 | 3.9 | 8.1 | 7.3 | 5.5 | 1.2 | 8.1 | 0.1 | 2.8 | 0.1 |

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit
5 $\Delta 6$ -Acetylenase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität codiert,
ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1,
10 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degene-
rierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1,
15 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nuklein-
säuresequenz ableiten,
 - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder
20 SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für
Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Amino-
säuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf
Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische
Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz
gemäß Anspruch 1.
- 25 3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte
Sequenz.
- 30 4. Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß
Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder
mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1
35 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
6. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ge-
mäß Anspruch 1 oder mindestens ein Expressionskassette gemäß
Anspruch 4 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 5.
- 40 7. Organismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus
um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.

8. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eine funktionelle oder nicht funktionelle Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
- 5
9. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden
- 10 Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
10. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
- 15
- 20
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit einer Dreifachbindung oder mit einer Doppelbindung in Δ -6-Position oder einer Dreifachbindung und Doppelbindung in Δ -6-Position aufweisen.
- 25
12. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen Mikroorganismus handelt.
- 30
13. Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz.
14. Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 10 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 35
15. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 13 oder 14 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.
- 40
16. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit mindestens einem der Proteine gemäß Anspruch 2, 13 oder 14 inkubiert.
- 45

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Triglyceride in Gegenwart einer Verbindung hergestellt werden, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.
- 5 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.
19. Ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 18.
- 10 20. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10, 16 oder 17.
- 15 21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
- 20 22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
- 25 23. Verwendung von ungesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 19 oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten gemäß Anspruch 20 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika.

30

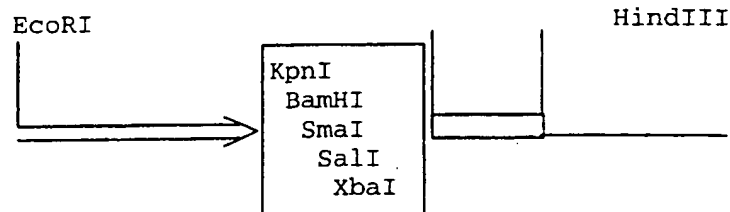
35

40

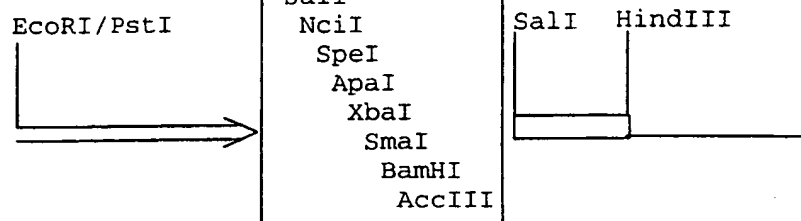
45

Fig. 1: Aufbau von Expressionskassetten

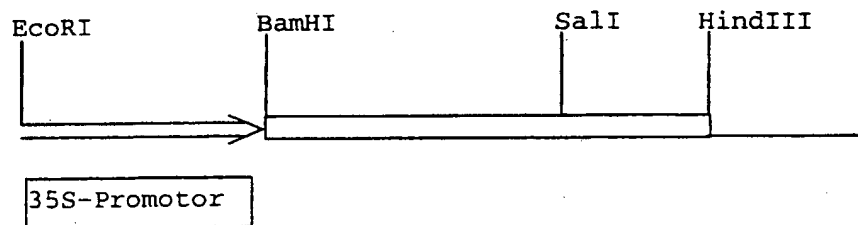
A) pBinAR



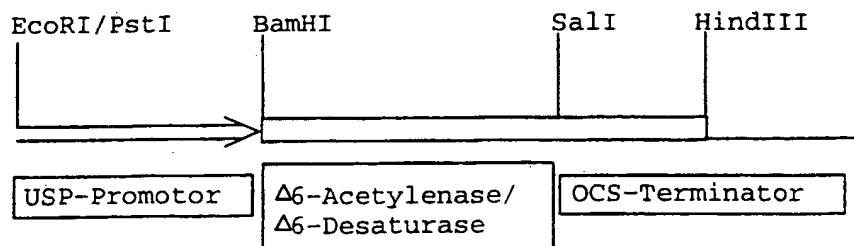
B) pBinUSP



C) pBinARI



D) pBIN-USP Cer1



USP = unbekanntes Samenprotein

35S = Promotor aus Blumenkohl-Terminator

OCS = Octopin Synthase Terminator

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> D6-Acetylenase und D6-Desaturase aus Ceratodon
purpureus

<130> 99 1388

<140>

<141>

<150> 19925718.3

<151> 1999-06-07

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2040

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<220>

<221> CDS

<222> (176)..(1627)

<400> 1

```
ctcaggcagg tctcagttga tgagacgctg agttctgaat cctttgagct gtgtcaggct 60
cggcacttgt gggatggtga aggagtgatc gatcaggagt gcaggagctg cattagtttc 120
tcagggtcga tcaggttatt ctgaaaaagg ctgcgtctgt gagcagtttg caaaa atg 178
                                         Met
                                         1

gcc ctc gtt acc gac ttt ctg aac ttt ctg ggc acg aca tgg agc aag 226
Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser Lys
          5              10              15

tac agc gtg tac acc cat agc tat gct gga aac tat ggg cct act ttg 274
Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr Leu
          20              25              30

aag cac gcc aaa aag gtt tct gct caa ggt aaa act gcg gga cag aca 322
Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln Thr
          35              40              45

ctg aga cag aga tcg gtg cag gac aaa aag cca ggc act tac tct ctg 370
Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser Leu
```

| 50 | 55 | 60 | 65 | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| gcc gat gtt gct tct cac gac agg cct gga gac tgc tgg atg atc gtc | | | | 418 |
| Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile Val | | | | |
| 70 | | 75 | 80 | |
| aaa gag aag gtg tat gat att agc cgt ttt gcg gac gac cac cct gga | | | | 466 |
| Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro Gly | | | | |
| 85 | 90 | 95 | | |
| ggg acg gta att agc acc tac ttt ggg cgg gat ggc aca gac gtt ttc | | | | 514 |
| Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe | | | | |
| 100 | 105 | 110 | | |
| gca aca ttc cat cca cct gcc gca tgg aag caa ctc aat gac tac tac | | | | 562 |
| Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr Tyr | | | | |
| 115 | 120 | 125 | | |
| att gga gac ctt gct agg gaa gag ccc ctt gat gaa ttg ctt aaa gac | | | | 610 |
| Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys Asp | | | | |
| 130 | 135 | 140 | 145 | |
| tac aga gat atg aga gcc gag ttt gtt aga gaa ggg ctt ttc aag agt | | | | 658 |
| Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys Ser | | | | |
| 150 | 155 | 160 | | |
| tcc aag gcc tgg ttc ctg ctt cag act ctg att aat gca gct ctc ttt | | | | 706 |
| Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu Phe | | | | |
| 165 | 170 | 175 | | |
| gct gcg agc att gcg act atc tgt tac gac aag agt tac tgg gct att | | | | 754 |
| Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala Ile | | | | |
| 180 | 185 | 190 | | |
| gtg ctg tca gcc agt ttg atg ggt ctc ttc gtc caa cag tgt gga tgg | | | | 802 |
| Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly Trp | | | | |
| 195 | 200 | 205 | | |
| ctt gcc cat gat ttc ctt cat caa cag gtc ttt gag aac cgt acc gcg | | | | 850 |
| Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr Ala | | | | |
| 210 | 215 | 220 | 225 | |
| aac tcc ttc ttt ggc tat ttg ttc ggc aat tgc gtg ctt ggc ttt agt | | | | 898 |
| Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe Ser | | | | |
| 230 | 235 | 240 | | |
| gta tca tgg tgg agg acg aag cac aac att cat cat act gct ccg aat | | | | 946 |
| Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro Asn | | | | |
| 245 | 250 | 255 | | |
| gag tgc gac gaa cag tac aca cct cta gac gaa gac att gat act ctc | | | | 994 |

| | | | | | | |
|---|-----------------|-------------|---------|-------------|-----|--|
| Glu Cys Asp | Glu Gln Tyr Thr | Pro Leu Asp | Glu Asp | Ile Asp Thr | Leu | |
| 260 | | 265 | | 270 | | |
| ccc atc att gcc tgg agc aag gaa att ttg gcc acc gtt gag agc aag | 1042 | | | | | |
| Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys | | | | | | |
| 275 | 280 | 285 | | | | |
| aga att ttg cga gtg ctt caa tat cag cac tac atg att ctg cct cta | 1090 | | | | | |
| Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro Leu | | | | | | |
| 290 | 295 | 300 | | 305 | | |
| ttg ttc atg gcc cgg tac agt tgg act ttt gga agt ttg ctc ttc aca | 1138 | | | | | |
| Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe Thr | | | | | | |
| | 310 | 315 | | 320 | | |
| ttc aat cct gat ttg agc acg acc aag gga ttg ata gag aag gga aca | 1186 | | | | | |
| Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly Thr | | | | | | |
| | 325 | 330 | | 335 | | |
| gtt gct ttt cac tac gcc tgg ttc agt tgg gct gcg ttc cat att ttg | 1234 | | | | | |
| Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile Leu | | | | | | |
| | 340 | 345 | | 350 | | |
| ccg ggt gtc gct aag cct ctt gcg tgg atg gta gca act gag ctt gtg | 1282 | | | | | |
| Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu Val | | | | | | |
| | 355 | 360 | | 365 | | |
| gcc ggt ttg ttg ttg gga ttc gtg ttt acg ttg agt cac aat gga aag | 1330 | | | | | |
| Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly Lys | | | | | | |
| 370 | 375 | 380 | | 385 | | |
| gag gtt tac aat gaa tcg aag gac ttc gtg aga gcc cag gtt att acc | 1378 | | | | | |
| Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile Thr | | | | | | |
| | 390 | 395 | | 400 | | |
| acc cgt aac acc aag cga ggc tgg ttc aac gat tgg ttc act ggg gga | 1426 | | | | | |
| Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly | | | | | | |
| | 405 | 410 | | 415 | | |
| ctc gac acc cag att gag cat cac ctg ttt cca aca atg ccc agg cac | 1474 | | | | | |
| Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His | | | | | | |
| | 420 | 425 | | 430 | | |
| aac tac ccc aag atc gca cct cag gtc gag gct ctt tgc aag aag cac | 1522 | | | | | |
| Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys His | | | | | | |
| | 435 | 440 | | 445 | | |
| ggc ctc gag tac gat aat gtc tcc gtc gtt ggt gcc tct gtc gcg gtt | 1570 | | | | | |
| Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala Val | | | | | | |
| 450 | 455 | 460 | | 465 | | |

gtg aag gcg ctc aag gaa att gct gat gaa gcg tca att cgg ctt cac 1618
 Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu His
 470 475 480

gct cac taa gaaatcgctg aactttgact attcattttt ttgcctggc 1667
 Ala His

tacctcaaat gttcgggagc aggtgcttgg cagtgtgttc aaccggagcg cactgaaaat 1727

gtgcagaatc catttccaga aattaccatt cctagctaaa tcttcttttt accaggtcgg 1787

atatatgaaa cttttttgat gcaacaagta gcattcaatt gaagacattg ttcgagatat 1847

aattcgcagt gtttctattc agcgggcata cgtactagtc catatcggcg gttgccgaga 1907

gtttacatta ttagttggca caacgagtag atctagtgtg aatttctatt tccgcatgta 1967

atattactct gaatatatac cgttatctat tttcctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2027

aaaaaaaaaa aaa 2040

<210> 2

<211> 483

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 2

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr
 20 25 30

Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln
 35 40 45

Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile
 65 70 75 80

Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro
 85 90 95

Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val
 100 105 110

Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr
 115 120 125

Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys
 130 135 140

Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu
 165 170 175

Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala
 180 185 190

Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly
 195 200 205

Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr
 210 215 220

Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe
 225 230 235 240

Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro
 245 250 255

Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr
 260 265 270

Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser
 275 280 285

Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro
 290 295 300

Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly
 325 330 335

Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile
 340 345 350

Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu
 355 360 365

Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly
 370 375 380

Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile
 385 390 395 400

Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly
 405 410 415
 Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg
 420 425 430
 His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys
 435 440 445
 His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala
 450 455 460
 Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu
 465 470 475 480
 His Ala His

<210> 3
 <211> 1467
 <212> DNA
 <213> Ceratodon purpureus

<220>
 <221> CDS
 <222> (10)..(1461)

<400> 3
 ggatccaaa atg gcc ctc gtt acc gac ttt ctg aac ttt ctg ggc acg aca 51
 Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr
 1 5 10

tgg agc aag tac agc gtg tac acc cat agc tat gct gga aac tat ggg 99
 Trp Ser Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly
 15 20 25 30

cct act ttg aag cac gcc aaa aag gtt tct gct caa ggt aaa act gcg 147
 Pro Thr Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala
 35 40 45

gga cag aca ctg aga cag aga tcg gtg cag gac aaa aag cca ggc act 195
 Gly Gln Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr
 50 55 60

tac tct ctg gcc gat gtt gct tct cac gac agg cct gga gac tgc tgg 243
 Tyr Ser Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp
 65 70 75

atg atc gtc aaa gag aag gtg tat gat att agc cgt ttt gcg gac gac 291
 Met Ile Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp

| 80 | 85 | 90 | |
|---|-----|-----|-----|
| cac cct gga ggg acg gta att agc acc tac ttt ggg cgg gat ggc aca | | | 339 |
| His Pro Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr | | | |
| 95 | 100 | 105 | 110 |
| gac gtt ttc gca aca ttc cat cca cct gcc gca tgg aag caa ctc aat | | | 387 |
| Asp Val Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| gac tac tac att gga gac ctt gct agg gaa gag ccc ctt gat gaa ttg | | | 435 |
| Asp Tyr Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| ctt aaa gac tac aga gat atg aga gcc gag ttt gtt aga gaa ggg ctt | | | 483 |
| Leu Lys Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu | | | |
| | 145 | 150 | 155 |
| ttc aag agt tcc aag gcc tgg ttc ctg ctt cag act ctg att aat gca | | | 531 |
| Phe Lys Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala | | | |
| | 160 | 165 | 170 |
| gct ctc ttt gct gcg agc att gcg act atc tgt tac gac aag agt tac | | | 579 |
| Ala Leu Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr | | | |
| 175 | 180 | 185 | 190 |
| tgg gct att gtg ctg tca gcc agt ttg atg ggt ctc ttc gtc caa cag | | | 627 |
| Trp Ala Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| tgt gga tgg ctt gcc cat gat ttc ctt cat caa cag gtc ttt gag aac | | | 675 |
| Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| cgt acc gcg aac tcc ttc ttt ggc tat ttg ttc ggc aat tgc gtg ctt | | | 723 |
| Arg Thr Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu | | | |
| | 225 | 230 | 235 |
| ggc ttt agt gta tca tgg tgg agg acg aag cac aac att cat cat act | | | 771 |
| Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr | | | |
| | 240 | 245 | 250 |
| gct ccg aat gag tgc gac gaa cag tac aca cct cta gac gaa gac att | | | 819 |
| Ala Pro Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile | | | |
| 255 | 260 | 265 | 270 |
| gat act ctc ccc atc att gcc tgg agc aag gaa att ttg gcc acc gtt | | | 867 |
| Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| gag agc aag aga att ttg cga gtg ctt caa tat cag cac tac atg att | | | 915 |

cgg ctt cac gct cac taa gtcgac 1467
Arg Leu His Ala His
480

<210> 4

<211> 483

<212> PRT

<213> *Ceratodon purpureus*

<400> 4

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr
 20 25 30

Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln
 35 40 45

Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile
 65 70 75 80

Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro
 85 90 95

Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val
 100 105 110

Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr
 115 120 125

Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys
 130 135 140

Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu
 165 170 175

Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala
 180 185 190

Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly
 195 200 205

Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr
 210 215 220

Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe
 225 230 235 240

Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro
 245 250 255
 Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr
 260 265 270
 Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser
 275 280 285
 Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro
 290 295 300
 Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe
 305 310 315 320
 Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly
 325 330 335
 Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile
 340 345 350
 Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu
 355 360 365
 Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly
 370 375 380
 Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile
 385 390 395 400
 Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly
 405 410 415
 Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg
 420 425 430
 His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys
 435 440 445
 His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala
 450 455 460
 Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu
 465 470 475 480
 His Ala His

<210> 5

<211> 520

<212> DNA

<213> *Ceratodon purpureus*

<400> 5

cattcatcat actgctccga atgagtgcga cgaacagtac acacctctag acgaagacat 60
tgatactctc cccatcattg cctggagcaa ggaaattttg gccaccgttg agagcaagag 120
aattttgcga gtgcttcgat atcagcacta catgattctg cctctattgt tcatggcccg 180
gtacagttgg acttttggaa gtttgctctt cacattcaat cctgatttga gcacgaccaa 240
gggattgata gagaagggaa cagttgcttt tcactacgcc tggttcagtt gggctgcgtt 300
ccatattttg ccgggtgtcg ctaagcctct tgcgtggatg gtagcaactg agcttgtggc 360
cggtttgttg ttgggattcg tgtttacgtt gagtcacaat ggaaaggagg tttaacaatga 420
atcgaaggac ttcgtgagag cccaggttat taccaccgt aacaccaagc gaggctggtt 480
caacgattgg ttcactgggg gactcgacac ccagattgag 520

<210> 6

<211> 173

<212> PRT

<213> *Ceratodon purpureus*

<400> 6

Ile His His Thr Ala Pro Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu
1 5 10 15
Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile
20 25 30
Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln
35 40 45
His Tyr Met Ile Leu Pro Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr
50 55 60
Phe Gly Ser Leu Leu Phe Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys
65 70 75 80
Gly Leu Ile Glu Lys Gly Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser
85 90 95
Trp Ala Ala Phe His Ile Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp
100 105 110
Met Val Ala Thr Glu Leu Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe

115

120

125

Thr Leu Ser His Asn Gly Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe
 130 135 140

Val Arg Ala Gln Val Ile Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe
 145 150 155 160

Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu
 165 170

<210> 7

<211> 514

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<400> 7

cctgcatcat gctgctccga atgaatgcga ccaaaagtac acgccgattg atgaggatat 60
 tgatactctc cccatcattg cttggagtaa agatctcttg gccactgttg agagcaagac 120
 catgttgcca gttcttcagt accagcacct attctttttg gttcttttga cgtttgcccg 180
 ggcgagttgg ctattttgga ggcgcgcctt cactctcagg cccgagttga cccttggcga 240
 gaagcttttg gagaggggaa cgatggcttt gcactacatt tggtttaata gtgttgcggt 300
 ttatctgctc cccggatgga aaccagttgt atggatgggtg gtcagcgagc tcatgtctgg 360
 tttcctgctg ggatacgtat ttgtactcag tcacaatgga atggaggtgt acaatacgtc 420
 aaaggacttc gtgaatgccg agattgcac gactcgcgac atcaaagcag ggggtgtttaa 480
 tgattgggtc accggaggtc tcaacagaca gatt 514

<210> 8

<211> 172

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 8

Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile
 1 5 10 15

Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu
 20 25 30

Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln
 35 40 45

His Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu
 50 55 60
 Phe Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn
 85 90 95
 Ser Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met
 100 105 110
 Val Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val
 115 120 125
 Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val
 130 135 140
 Asn Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
 165 170

<210> 9

<211> 535

<212> DNA

<213> *Ceratodon purpureus*

<400> 9

tgctcatcac atcgctgta atagtataga atatgatcca gacctacagt acatccccct 60
 ttttgcagtg acatcaaagc tcttctctaa cctctactcc tacttctatg aaagggttat 120
 gccattcgat ggcgtagcac gctctctgat tgctaccag cactggacgt tttatccaat 180
 aatggctgtt gctcgggtga acctctttgc ccaatccctt ctagtactga cctcgaagaa 240
 gcatgtgcca gacaggtggc ttgagctcgg tgctatcggg ttcttctacc tgtggttctt 300
 caccctcttg tcgtacctgc cactgcacc ggagaggctt gcttctctcc ttgtcagttt 360
 tgcagtgaca gggatccagc atgtacagtt ttgcctgaac cacttctcat cgccgggttta 420
 tctaggacag ccgaagagca aggcttgggt tgaatctcaa gcacggggca ctctcaatct 480
 ctctacaccg gcttacatgg attggtttca cgggggtctt cagttccaga tcgag 535

<210> 10
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Ceratodon purpureus

<400> 10
 Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Ile Glu Tyr Asp Pro Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 Tyr Ile Pro Leu Phe Ala Val Thr Ser Lys Leu Phe Ser Asn Leu Tyr
 20 25 30
 Ser Tyr Phe Tyr Glu Arg Val Met Pro Phe Asp Gly Val Ala Arg Ser
 35 40 45
 Leu Ile Ala Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro Ile Met Ala Val Ala
 50 55 60
 Arg Val Asn Leu Phe Ala Gln Ser Leu Leu Val Leu Thr Ser Lys Lys
 65 70 75 80
 His Val Pro Asp Arg Trp Leu Glu Leu Gly Ala Ile Gly Phe Phe Tyr
 85 90 95
 Leu Trp Phe Phe Thr Leu Leu Ser Tyr Leu Pro Thr Ala Pro Glu Arg
 100 105 110
 Leu Ala Phe Val Leu Val Ser Phe Ala Val Thr Gly Ile Gln His Val
 115 120 125
 Gln Phe Cys Leu Asn His Phe Ser Ser Pro Val Tyr Leu Gly Gln Pro
 130 135 140
 Lys Ser Lys Ala Trp Val Glu Ser Gln Ala Arg Gly Thr Leu Asn Leu
 145 150 155 160
 Ser Thr Pro Ala Tyr Met Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln
 165 170 175
 Ile Glu

<210> 11
 <211> 2160
 <212> DNA
 <213> Ceratodon purpureus

<220>
 <221> CDS
 <222> (159)..(1721)

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| cgagaggtctc | ttgtcggtct | tggagttctgt | gtcagagcttg | gaatgcggta | ggcgcggccg | 60 |
| tttcgtgggt | ttggcggttg | cattgcgcga | gggcggacag | tgggagtgcg | ggaggtctgt | 120 |
| ttgtgcatga | cgaggtgggt | gtaatcttcg | ccggcaga | atg | gtg | 176 |
| | | | | Met | Val | |
| | | | | 1 | 5 | |
| ggt | ctc | tcg | cag | ggt | tcc | 224 |
| Gly | Leu | Ser | Gln | Gly | Ser | |
| | | | 10 | | | |
| gca | acg | atg | ccc | ctc | gtc | 272 |
| Ala | Thr | Met | Pro | Leu | Val | |
| | | | 25 | | | |
| ttg | ggc | cag | tgg | agt | ctt | 320 |
| Leu | Gly | Gln | Trp | Ser | Leu | |
| | | | 40 | | | |
| act | aag | aaa | cac | agt | tcg | 368 |
| Thr | Lys | Lys | His | Ser | Ser | |
| 55 | | | | | 60 | |
| ggt | gcg | cgg | ggg | cca | ggt | 416 |
| Val | Ala | Arg | Gly | Pro | Val | |
| | | | | 75 | | |
| atc | agg | cgg | agg | tgg | gtg | 464 |
| Ile | Arg | Arg | Arg | Trp | Val | |
| | | | 90 | | | |
| aag | gat | gta | gct | tcg | cac | 512 |
| Lys | Asp | Val | Ala | Ser | His | |
| | | | 105 | | | |
| aaa | gag | aag | gtg | tat | gat | 560 |
| Lys | Glu | Lys | Val | Tyr | Asp | |
| | | | 120 | | | |
| ggc | acg | ggt | atc | aac | acc | 608 |
| Gly | Thr | Val | Ile | Asn | Thr | |
| 135 | | | | | 140 | |
| tct | act | ttc | cac | gca | tcc | 656 |
| Ser | Thr | Phe | His | Ala | Ser | |
| | | | | 155 | | |
| atc | ggg | aac | ctt | ggt | agg | 704 |
| | | | | | | |

16

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Ile | Gly | Asn | Leu | Val | Arg | Glu | Glu | Pro | Thr | Leu | Glu | Leu | Leu | Lys | Glu | | |
| | | | 170 | | | | | 175 | | | | | 180 | | | | |
| tac | aga | gag | ttg | aga | gcc | ctt | ttc | ttg | aga | gaa | cag | ctt | ttc | aag | agt | 752 | |
| Tyr | Arg | Glu | Leu | Arg | Ala | Leu | Phe | Leu | Arg | Glu | Gln | Leu | Phe | Lys | Ser | | |
| | | 185 | | | | | 190 | | | | | 195 | | | | | |
| tcc | aaa | tcc | tac | tac | ctt | ttc | aag | act | ctc | ata | aat | gtt | tcc | att | gtt | 800 | |
| Ser | Lys | Ser | Tyr | Tyr | Leu | Phe | Lys | Thr | Leu | Ile | Asn | Val | Ser | Ile | Val | | |
| | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 | | | | | | |
| gcc | aca | agc | att | gcg | ata | atc | agt | ctg | tac | aag | tct | tac | cgg | gcg | gtt | 848 | |
| Ala | Thr | Ser | Ile | Ala | Ile | Ile | Ser | Leu | Tyr | Lys | Ser | Tyr | Arg | Ala | Val | | |
| 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | | | | | 230 | | |
| ctg | tta | tca | gcc | agt | ttg | atg | ggc | ttg | ttt | att | caa | cag | tgc | gga | tgg | 896 | |
| Leu | Leu | Ser | Ala | Ser | Leu | Met | Gly | Leu | Phe | Ile | Gln | Gln | Cys | Gly | Trp | | |
| | | | 235 | | | | | 240 | | | | | 245 | | | | |
| ttg | tct | cac | gat | ttt | cta | cac | cat | cag | gta | ttt | gag | aca | cgc | tgg | ctc | 944 | |
| Leu | Ser | His | Asp | Phe | Leu | His | His | Gln | Val | Phe | Glu | Thr | Arg | Trp | Leu | | |
| | | 250 | | | | | | 255 | | | | | 260 | | | | |
| aat | gac | gtt | gtt | ggc | tat | gtg | gtc | ggc | aac | gtt | gtt | ctg | gga | ttc | agt | 992 | |
| Asn | Asp | Val | Val | Gly | Tyr | Val | Val | Gly | Asn | Val | Val | Leu | Gly | Phe | Ser | | |
| | 265 | | | | | | 270 | | | | | 275 | | | | | |
| gtc | tcg | tgg | tgg | aag | acc | aag | cac | aac | ctg | cat | cat | gct | gct | ccg | aat | 1040 | |
| Val | Ser | Trp | Trp | Lys | Thr | Lys | His | Asn | Leu | His | His | Ala | Ala | Pro | Asn | | |
| | 280 | | | | | 285 | | | | | 290 | | | | | | |
| gaa | tgc | gac | caa | aag | tac | aca | ccg | att | gat | gag | gat | att | gat | act | ctc | 1088 | |
| Glu | Cys | Asp | Gln | Lys | Tyr | Thr | Pro | Ile | Asp | Glu | Asp | Ile | Asp | Thr | Leu | | |
| 295 | | | | | 300 | | | | | 305 | | | | | 310 | | |
| ccc | atc | att | gct | tgg | agt | aaa | gat | ctc | ttg | gcc | act | gtt | gag | agc | aag | 1136 | |
| Pro | Ile | Ile | Ala | Trp | Ser | Lys | Asp | Leu | Leu | Ala | Thr | Val | Glu | Ser | Lys | | |
| | | | 315 | | | | | 320 | | | | | 325 | | | | |
| acc | atg | ttg | cga | gtt | ctt | cag | tac | cag | cac | cta | ttc | ttt | ttg | gtt | ctt | 1184 | |
| Thr | Met | Leu | Arg | Val | Leu | Gln | Tyr | Gln | His | Leu | Phe | Phe | Leu | Val | Leu | | |
| | | | 330 | | | | | 335 | | | | | 340 | | | | |
| ttg | acg | ttt | gcc | cgg | gcg | agt | tgg | cta | ttt | tgg | agc | gcg | gcc | ttc | act | 1232 | |
| Leu | Thr | Phe | Ala | Arg | Ala | Ser | Trp | Leu | Phe | Trp | Ser | Ala | Ala | Phe | Thr | | |
| | 345 | | | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | |
| ctc | agg | ccc | gag | ttg | acc | ctt | ggc | gag | aag | ctt | ttg | gag | agg | gga | acg | 1280 | |
| Leu | Arg | Pro | Glu | Leu | Thr | Leu | Gly | Glu | Lys | Leu | Leu | Glu | Arg | Gly | Thr | | |
| | 360 | | | | | 365 | | | | | 370 | | | | | | |

atg gct ttg cac tac att tgg ttt aat agt gtt gcg ttt tat ctg ctc 1328
 Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser Val Ala Phe Tyr Leu Leu
 375 380 385 390

ccc gga tgg aaa cca gtt gta tgg atg gtg gtc agc gag ctc atg tct 1376
 Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val Val Ser Glu Leu Met Ser
 395 400 405

ggt ttc ctg ctg gga tac gta ttt gta ctc agt cac aat gga atg gag 1424
 Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu
 410 415 420

gtg tac aat acg tca aag gac ttc gtg aat gcc cag att gca tcg act 1472
 Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn Ala Gln Ile Ala Ser Thr
 425 430 435

cgc gac atc aaa gca ggg gtg ttt aat gat tgg ttc acc gga ggt ctc 1520
 Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu
 440 445 450

aac aga cag att gag cat cat cta ttt cca acg atg ccc agg cac aac 1568
 Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn
 455 460 465 470

ctt aat aaa att tct cct cac gtg gag act ttg tgc aag aag cat gga 1616
 Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr Leu Cys Lys Lys His Gly
 475 480 485

ctg gtc tac gaa gac gtg agc atg gct tcg ggc act tac cgg gtt ttg 1664
 Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Val Leu
 490 495 500

aaa aca ctt aag gac gtt gcc gat gct gct tca cac cag cag ctt gct 1712
 Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala Ser His Gln Gln Leu Ala
 505 510 515

gcg agt tga ggcatcgag cactcgtcga aacatttttg tctgttatag 1761
 Ala Ser
 520

tgttcatatg tgatcgaggg gaaaagggtcc catgctctga tctattcttc tgtagccaat 1821

atttttcaat tgaaaggagg ttcttcactt atcttccatc tatcggttgca catcctgcat 1881

cagagttagc gttggagtaa tgtaagcac ttgtagatta tgcccacat tgccacattt 1941

ctgttcgggtt acaatcgttt gattccatgc tatcctccgt gttcatctcg ttgttataag 2001

caagcttgaa aaaacatgct acgagattgg cagacgttgt cttggcagct gtagagggtg 2061

gttccattca ttgtgtagta cagaactctc tcgtccctgt ttctctacat tacttggttac 2121

atagtgactt tcattcacag caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

2160

<210> 12

<211> 520

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 12

Met Val Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Leu Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu
20 25 30

Asn Val Leu Gly Thr Thr Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe
35 40 45

Ala Phe Lys Arg Leu Thr Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val
50 55 60

Glu Ala Gln Lys Glu Ser Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser
65 70 75 80

Gln Ser Val Ala Gln Pro Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys
85 90 95

Pro Val Thr Tyr Ser Leu Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln
100 105 110

Asp Cys Trp Ile Ile Ile Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe
115 120 125

Ala Glu Gln His Pro Gly Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg
130 135 140

Asp Ala Thr Asp Val Phe Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys
145 150 155 160

Ile Leu Gln Asn Phe Tyr Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr
165 170 175

Leu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg
180 185 190

Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu
195 200 205

Ile Asn Val Ser Ile Val Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr
210 215 220

Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe
 225 230 235 240

Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val
 245 250 255

Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn
 260 265 270

Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu
 275 280 285

His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp
 290 295 300

Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu
 305 310 315 320

Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His
 325 330 335

Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe
 340 345 350

Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys
 355 360 365

Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser
 370 375 380

Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val
 385 390 395 400

Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu
 405 410 415

Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn
 420 425 430

Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp
 435 440 445

Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro
 450 455 460

Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr
 465 470 475 480

Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser
 485 490 495

Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala
500 505 510

Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser
515 520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/82 C12N1/19 C12P7/64
C12Q1/68 C11C1/00 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C12Q C11C A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document | 19, 20 |
| A | --- | 13 |
| X | WO 96 21022 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11 July 1996 (1996-07-11) cited in the application | 19, 20 |
| A | the whole document | 1-18, 21-23 |
| X | WO 97 37033 A (BAFOR MAUREEN ; BANAS ANTONI (PL); DAHLQVIST ANDERS (SE); GUMMESON) 9 October 1997 (1997-10-09) the whole document | 19, 20 |
| A | --- | 1-18, 21-23 |
| | --- -/- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) claims | 19,20 |
| A | | 1-18, 21-23 |
| A | --- GIRKE T ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL DELTA6-ACYL-GROUP DESATURASE BY TARGETED GENE DISRUPTION IN PHYSCOMITRELLA PATENS" PLANT JOURNAL, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, vol. 15, no. 1, 1998, pages 39-48, XP000881712 ISSN: 0960-7412 cited in the application the whole document | 1-23 |
| A | --- KOHN GERHARD ET AL: "Biosynthesis of acetylenic fatty acids in the moss Ceratodon purpureus (Hedw.) Brid." JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, vol. 144, no. 3, 1994, pages 265-271, XP000960337 ISSN: 0176-1617 page 269, column 2, paragraph 3 -page 270; figure 9 | 1-23 |
| A | --- BEUTELMANN, PETER ET AL: "An uncommon pathway in the biosynthesis of acetylenic fatty acids in mosses" PLANT LIPID METAB., 'PAP. INT. MEET. PLANT LIPIDS!', 11TH (1995), MEETING DATE 1994, 546-8. EDITOR(S): KADER, JEAN-CLAUDE; MAZLIAK, PAUL. PUBLISHER: KLUWER, DORDRECHT, NETH. , XP000960428 the whole document | 1-23 |
| A | --- SPERLING PETRA ET AL: "A sphingolipid desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome b5 fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 44, 30 October 1998 (1998-10-30), pages 28590-28596, XP000882772 ISSN: 0021-9258 figure 1 | 14 |
| | --- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/05274

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| P, X | <p>SPERLING PETRA ET AL: "A bifunctional DELTA6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss Ceratodon purpureus: A new member of the cytochrome b5 superfamily." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 267, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 3801-3811, XP000960307 ISSN: 0014-2956 the whole document -----</p> | 1-23 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9846763 A | 22-10-1998 | US 5968809 A | 19-10-1999 |
| | | AU 6961698 A | 11-11-1998 |
| | | AU 720677 B | 08-06-2000 |
| | | AU 7114798 A | 11-11-1998 |
| | | BG 103797 A | 28-04-2000 |
| | | BG 103798 A | 31-05-2000 |
| | | BR 9808506 A | 23-05-2000 |
| | | BR 9808507 A | 23-05-2000 |
| | | CN 1252099 T | 03-05-2000 |
| | | CN 1253588 T | 17-05-2000 |
| | | EP 0975766 A | 02-02-2000 |
| | | EP 0996732 A | 03-05-2000 |
| | | NO 994925 A | 30-11-1999 |
| | | NO 994926 A | 30-11-1999 |
| | | PL 336077 A | 05-06-2000 |
| | | PL 336143 A | 05-06-2000 |
| | | WO 9846764 A | 22-10-1998 |
| WO 9621022 A | 11-07-1996 | US 5614393 A | 25-03-1997 |
| | | AU 707061 B | 01-07-1999 |
| | | AU 4673596 A | 24-07-1996 |
| | | BR 9510411 A | 19-05-1998 |
| | | CA 2207906 A | 11-07-1996 |
| | | CN 1177379 A | 25-03-1998 |
| | | EP 0801680 A | 22-10-1997 |
| | | JP 10511848 T | 17-11-1998 |
| | | US 5789220 A | 04-08-1998 |
| WO 9737033 A | 09-10-1997 | AU 720765 B | 08-06-2000 |
| | | AU 1818797 A | 22-10-1997 |
| | | CA 2250234 A | 09-10-1997 |
| | | CZ 9803135 A | 12-05-1999 |
| | | EP 0889970 A | 13-01-1999 |
| | | JP 2000507450 T | 20-06-2000 |
| | | NO 984448 A | 30-11-1998 |
| | | PL 329175 A | 15-03-1999 |
| WO 9846764 A | 22-10-1998 | US 5972664 A | 26-10-1999 |
| | | US 6075183 A | 13-06-2000 |
| | | US 5968809 A | 19-10-1999 |
| | | US 6051754 A | 18-04-2000 |
| | | AU 720677 B | 08-06-2000 |
| | | AU 7114798 A | 11-11-1998 |
| | | AU 720725 B | 08-06-2000 |
| | | AU 7114898 A | 11-11-1998 |
| | | BG 103796 A | 31-05-2000 |
| | | BG 103798 A | 31-05-2000 |
| | | BR 9808506 A | 23-05-2000 |
| | | BR 9809083 A | 01-08-2000 |
| | | CN 1253587 T | 17-05-2000 |
| | | CN 1253588 T | 17-05-2000 |
| | | EP 0996732 A | 03-05-2000 |
| | | EP 1007691 A | 14-06-2000 |
| | | NO 994924 A | 30-11-1999 |
| | | NO 994926 A | 30-11-1999 |
| | | PL 336067 A | 05-06-2000 |
| | | PL 336077 A | 05-06-2000 |
| | | WO 9846765 A | 22-10-1998 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05274

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9846764 A | | AU 6961698 A | 11-11-1998 |
| | | BG 103797 A | 28-04-2000 |
| | | BR 9808507 A | 23-05-2000 |
| | | CN 1252099 T | 03-05-2000 |
| | | EP 0975766 A | 02-02-2000 |
| | | NO 994925 A | 30-11-1999 |
| | | PL 336143 A | 05-06-2000 |
| | | WO 9846763 A | 22-10-1998 |
| <hr/> | | | |

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/82 C12N1/19 C12P7/64
C12Q1/68 C11C1/00 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C12Q C11C A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) das ganze Dokument | 19,20 |
| A | --- | 13 |
| X | WO 96 21022 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11. Juli 1996 (1996-07-11) in der Anmeldung erwähnt | 19,20 |
| A | das ganze Dokument | 1-18, 21-23 |
| X | WO 97 37033 A (BAFOR MAUREEN ; BANAS ANTONI (PL); DAHLQVIST ANDERS (SE); GUMMESON) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) das ganze Dokument | 19,20 |
| A | --- | 1-18, 21-23 |
| | --- -/- | |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) Ansprüche | 19,20 |
| A | --- | 1-18, 21-23 |
| A | GIRKE T ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL DELTA6-ACYL-GROUP DESATURASE BY TARGETED GENE DISRUPTION IN PHYSCOMITRELLA PATENS" PLANT JOURNAL,GB,BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, Bd. 15, Nr. 1, 1998, Seiten 39-48, XP000881712 ISSN: 0960-7412 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument | 1-23 |
| A | --- | |
| A | KOHN GERHARD ET AL: "Biosynthesis of acetylenic fatty acids in the moss Ceratodon purpureus (Hedw.) Brid." JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 144, Nr. 3, 1994, Seiten 265-271, XP000960337 ISSN: 0176-1617 Seite 269, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 270; Abbildung 9 | 1-23 |
| A | --- | |
| A | BEUTELMANN, PETER ET AL: "An uncommon pathway in the biosynthesis of acetylenic fatty acids in mosses" PLANT LIPID METAB., 'PAP. INT. MEET. PLANT LIPIDS!', 11TH (1995), MEETING DATE 1994, 546-8. EDITOR(S): KADER, JEAN-CLAUDE;MAZLIAK, PAUL. PUBLISHER: KLUWER, DORDRECHT, NETH. , XP000960428 das ganze Dokument | 1-23 |
| A | --- | |
| A | SPERLING PETRA ET AL: "A sphingolipid desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome b5 fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 44, 30. Oktober 1998 (1998-10-30), Seiten 28590-28596, XP000882772 ISSN: 0021-9258 Abbildung 1 | 14 |
| | --- | |
| | -/-- | |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| P,X | <p>SPERLING PETRA ET AL: "A bifunctional DELTA6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss Ceratodon purpureus: A new member of the cytochrome b5 superfamily." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 267, Nr. 12, Juni 2000 (2000-06), Seiten 3801-3811, XP000960307 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p> | 1-23 |

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9846763 A | 22-10-1998 | US 5968809 A | 19-10-1999 |
| | | AU 6961698 A | 11-11-1998 |
| | | AU 720677 B | 08-06-2000 |
| | | AU 7114798 A | 11-11-1998 |
| | | BG 103797 A | 28-04-2000 |
| | | BG 103798 A | 31-05-2000 |
| | | BR 9808506 A | 23-05-2000 |
| | | BR 9808507 A | 23-05-2000 |
| | | CN 1252099 T | 03-05-2000 |
| | | CN 1253588 T | 17-05-2000 |
| | | EP 0975766 A | 02-02-2000 |
| | | EP 0996732 A | 03-05-2000 |
| | | NO 994925 A | 30-11-1999 |
| | | NO 994926 A | 30-11-1999 |
| | | PL 336077 A | 05-06-2000 |
| | | PL 336143 A | 05-06-2000 |
| | | WO 9846764 A | 22-10-1998 |
| WO 9621022 A | 11-07-1996 | US 5614393 A | 25-03-1997 |
| | | AU 707061 B | 01-07-1999 |
| | | AU 4673596 A | 24-07-1996 |
| | | BR 9510411 A | 19-05-1998 |
| | | CA 2207906 A | 11-07-1996 |
| | | CN 1177379 A | 25-03-1998 |
| | | EP 0801680 A | 22-10-1997 |
| | | JP 10511848 T | 17-11-1998 |
| | | US 5789220 A | 04-08-1998 |
| WO 9737033 A | 09-10-1997 | AU 720765 B | 08-06-2000 |
| | | AU 1818797 A | 22-10-1997 |
| | | CA 2250234 A | 09-10-1997 |
| | | CZ 9803135 A | 12-05-1999 |
| | | EP 0889970 A | 13-01-1999 |
| | | JP 2000507450 T | 20-06-2000 |
| | | NO 984448 A | 30-11-1998 |
| | | PL 329175 A | 15-03-1999 |
| WO 9846764 A | 22-10-1998 | US 5972664 A | 26-10-1999 |
| | | US 6075183 A | 13-06-2000 |
| | | US 5968809 A | 19-10-1999 |
| | | US 6051754 A | 18-04-2000 |
| | | AU 720677 B | 08-06-2000 |
| | | AU 7114798 A | 11-11-1998 |
| | | AU 720725 B | 08-06-2000 |
| | | AU 7114898 A | 11-11-1998 |
| | | BG 103796 A | 31-05-2000 |
| | | BG 103798 A | 31-05-2000 |
| | | BR 9808506 A | 23-05-2000 |
| | | BR 9809083 A | 01-08-2000 |
| | | CN 1253587 T | 17-05-2000 |
| | | CN 1253588 T | 17-05-2000 |
| | | EP 0996732 A | 03-05-2000 |
| | | EP 1007691 A | 14-06-2000 |
| | | NO 994924 A | 30-11-1999 |
| | | NO 994926 A | 30-11-1999 |
| | | PL 336067 A | 05-06-2000 |
| | | PL 336077 A | 05-06-2000 |
| | | WO 9846765 A | 22-10-1998 |

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9846764 A | | AU 6961698 A | 11-11-1998 |
| | | BG 103797 A | 28-04-2000 |
| | | BR 9808507 A | 23-05-2000 |
| | | CN 1252099 T | 03-05-2000 |
| | | EP 0975766 A | 02-02-2000 |
| | | NO 994925 A | 30-11-1999 |
| | | PL 336143 A | 05-06-2000 |
| | | WO 9846763 A | 22-10-1998 |
